

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК микобактерий
туберкулёзного комплекса методом полимеразной цепной реакции

в режиме реального времени

«РеалБест ДНК МВТС»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «РеалБест ДНК МВТС» предназначен для выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса (*Mycobacterium tuberculosis complex*), который включает в себя виды микобактерий, вызывающих туберкулёз у человека (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum*), выделенных из клинических образцов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Набор предназначен для применения с регистрирующими амплификаторами как роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия), так и планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналогами.

Набор реагентов «РеалБест ДНК МВТС» может быть применен в клинической практике для анализа клинического материала: цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, мочи, бронхоальвеолярного лаважа, мокроты, синовиальной жидкости.

Набор рассчитан на проведение анализа 48 образцов, включая контрольные. Обеспечивает возможность проведения до 8 независимых процедур выделения по 6 образцов в каждой, включая контроли.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: директором по производству Ткачевым В.К. и нач. отделения производства ПЦР наборов Трухиной А.В.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода.

Принцип анализа основан на выделении нуклеиновых кислот из пробы совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом и проведении реакции амплификации выбранного фрагмента ДНК с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени.

Комплект реагентов для выделения предназначен для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов цельной крови, сыворотки (плазмы) крови, биоптатов, ликвора, мочи, бронхоальвеолярного лаважа, мокроты, синовиальной жидкости, соскобов эпителиальных клеток.

Для удобства работы с густыми образцами и образцами, содержащими комки слизи (мокрота, синовиальная жидкость) в набор включен раствор для обработки мокроты. При выделении нуклеиновых кислот из цельной крови выделение проводится из 50 мкл пробы.

Принцип ПЦР-анализа основан на регистрации процесса амплификации выбранного участка ДНК возбудителя инфекции в ходе проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурная денатурация ДНК-матрицы, отжиг праймеров с комплементарными последовательностями ДНК-матрицы, синтез комплементарной цепи с этих праймеров Taq-полимеразой.

В основе регистрации процесса амплификации лежит измерение сигналов флуоресценции в каждом цикле ПЦР. При этом измеряемая интенсивность флуоресценции зависит от количества образовавшихся специфических ампликонов и динамика нарастания флуоресценции определяется исходным количеством ДНК возбудителя инфекции в образце.

Учёт эффективности выделения ДНК из образцов обеспечивается выделением ДНК возбудителя инфекции из клинических проб совместно с предварительно внесённым внутренним контрольным образцом (ВКО).

2.2. Состав набора:

Комплект реагентов для обработки клинических проб и выделения ДНК

раствор для обработки мокроты – 4 фл. по 50 мл;

лизирующий раствор – 8 фл. по 4 мл;

осадитель НК – 4 фл. по 12 мл;

раствор для отмывки №1 – 4 фл. по 8 мл;

раствор для отмывки №2 – 4 фл. по 5 мл;

элюирующий раствор – 4 фл. по 3 мл;

сорбент (суспензия магнитных частиц) – 1 фл., 1 мл.

Комплект контрольных образцов

раствор для восстановления контрольных образцов (РВК) – 1 фл., 4 мл;

положительный контрольный образец (ПКО) – 1 пр., 1 мл;

отрицательный контрольный образец (ОКО) – 2 фл. по 1 мл;

внутренний контрольный образец (лиофилизированный концентрат), (ВКО) – 2 фл.

Комплект реагентов для проведения ПЦР

готовая реакционная смесь для ПЦР (ГРС), лиофилизированная – 48 пробирок.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность – выявление 100 копий ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса по стандартному образцу предприятия – 100%.

3.2. Специфичность выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса по стандартному образцу предприятия – 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. При работе с набором следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Для проведения реакции амплификации с детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.7. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.

4.8. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами

дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор ДП-2Т; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»).

4.9. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– амплификатор с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени роторного типа: «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия) или планшетного типа: «iQ iCycler», «iQ5 iCycler», «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) или их аналог;

– ламинарный бокс 2-го класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01, «Ламинар-с», ЗАО «Ламинарные системы»);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf MiniSpin» (фирма Eppendorf, Германия);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объемом, со сменными наконечниками (фирма Biohit, Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые нестерильные неопудренные латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», фирма Ansell HealthCare, Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером/ (фирма FinnTip, Финляндия);

– одноразовые полипропиленовые пробирки на 2 мл (фирма SSI, США, кат. № 2340);

– магнитный штатив для выделения нуклеиновых кислот (ЗАО «Вектор-Бест», кат. № E9291);

– штативы для микропробирок вместимостью 2 мл и 0,2 мл (фирма Хеликон, Россия);

– отсасыватель медицинский (В-40, «ВИСМА-ПЛАНАР»);

– контейнер для сброса отходов (например, «Контейнер для сброса острого инструментария – ЕК-01», фирма КМ-ПРОЕКТ, или аналогичный).

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов цельной крови

Внимание. Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.

Кровь забирается в вакуумную пробирку с ЭДТА или с цитратом натрия. После забора крови ее необходимо плавными движениями перемешать с антикоагулянтом, находящимся в пробирке.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч. Замораживание цельной крови не допустимо.

6.2. Подготовка образцов сыворотки (плазмы) крови

Внимание. Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной плазмы.

В течение 6 часов после взятия крови следует отобрать сыворотку (плазму) в отдельную пробирку.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более суток; при температуре минус 20 °С до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

Образцы сыворотки или плазмы крови перед использованием необходимо центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °С.

6.3. Подготовка биоптатов и ликвора

Биоптаты и ликвор готовы к анализу.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более суток; при температуре минус 20 °С до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.4. Подготовка образцов мочи.

Первую порцию утренней мочи собрать в чистый флакон с плотной крышкой. 1,5-2,0 мл мочи отобрать в пробирку, центрифугировать при 3000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удалить практически полностью, не задевая осадок. Полученный образец использовать для выделения нуклеиновых кислот.

Допускается хранение подготовленных образцов из мочи в замороженном состоянии при температуре минус 20 °С в течение 1 недели.

6.5. Подготовка образцов соскобов эпителиальных клеток, культур микроорганизмов, смывов с объектов окружающей среды.

Образец забрать одноразовым зондом в пробирку с транспортной средой, тщательно перемешать. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок. Клеточный осадок (при наличии такового) ресуспендировать пипетированием.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °С до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °С не более суток; при температуре минус 20 °С до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.6. Подготовка бронхоальвеолярного лаважа или промывных вод бронхов.

Содержимое контейнера перемешать переворачиванием, 1,5-2 мл образца перенести в пробирку, центрифугировать при 13 000 об/мин 5 минут. Супернатант удалить, не задевая осадок, оставляя 200 мкл образца. Осадок ресуспендировать, отобрать для анализа 100 мкл образца, не захватывая комки слизи. При большом объеме слизи, обработать пробу согласно пункту 6.7.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °C до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °C не более суток; при температуре минус 20 °C до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

6.7. Подготовка мокроты, синовиальной жидкости.

К образцу мокроты (синовиальной жидкости) добавить равный объем **Раствора для обработки мокроты**. Тщательно перемешать, выдержать 10 минут при комнатной температуре. Еще раз тщательно перемешать. 100 мкл полученной взвеси использовать для выделения нуклеиновых кислот. Не захватывать комки слизи.

Транспортировать и хранить образцы при температуре от 18 до 25 °C до 2 ч; при температуре от 2 до 8 °C не более суток; при температуре минус 20 °C до 2 недель. Повторное замораживание-оттаивание проб не допускается.

*Каждая группа образцов, проходящая через процедуру выделения ДНК, должна содержать **положительный и отрицательный контрольные образцы**.*

6.8. Подготовка компонентов набора:

6.8.1. Перед началом работы извлечь набор реагентов из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать анализируемые образцы и компоненты набора при температуре от 18 до 25 °C в течение 30 мин.

6.8.2. Во флакон с внутренним контрольным образцом (ВКО) добавить 1,0 мл раствора для восстановления контрольных образцов (РВК), аккуратно перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре, после чего вновь тщательно перемешать.

После разведения хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 1 мес.

6.8.3. Отрицательный контрольный образец (ОКО) готов к применению.

После вскрытия флакона хранить при температуре от 2 до 8 °C не более 1 мес.

6.8.4. Лизирующий раствор перед началом работы прогреть при температуре от 50 до 60 °C до растворения осадка. Перемешать на вортексе содержимое флакона с сорбентом до состояния гомогенной суспензии и во флакон с лизирующим раствором добавить 80 мкл суспензии сорбента. Тщательно перемешать.

Внимание! При работе с биоптатами (тканевым материалом) перед началом работы не добавлять суспензию сорбента в лизирующий раствор. Лизирующий раствор после вскрытия и добавления суспензии сорбента хранению не подлежит.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ БИОПРОБ

7.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объемом 2 мл (по количеству исследуемых образцов, включая необходимые контроли).

7.2. В каждую пробирку внести по 30 мкл раствора ВКО.

7.3. Для отрицательного контроля в пробирку, маркированную «ОКО», внести 100 мкл ОКО.

7.4. Для положительного контроля в пробирку (пробирки), маркированные «ПКО», внести 70 мкл ОКО и 30 мкл ПКО.

7.5. В остальные пробирки пипеткой с отдельными наконечниками внести по 100 мкл анализируемых образцов в соответствии с маркировкой пробирок. При выделении НК из цельной крови выделение проводится из 50 мкл пробы.

7.6. В каждую пробирку, не задевая стенок, внести по 300 мкл лизирующего раствора с сорбентом. (При выделении НК из биоптатов - по 300 мкл лизирующего раствора без сорбента). Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Выдержать в термошейкере в течение 5 мин при 65°C с частотой вращения 1300 об/мин. Коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

В случае если образец биоптата лизировался не полностью, перенести содержимое в чистую пробирку, стараясь не захватить осадок, затем добавить 10 мкл суспензии сорбента, тщательно перемешать.

7.7. В каждую пробирку с анализируемыми образцами внести по 400 мкл осадителя НК.

7.8. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C.

7.9. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок.

7.10. В каждую пробирку к осадку добавить 500 мкл раствора для отмывки № 1. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 с. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 мин на микроцентрифуге.

7.11. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.12. В каждую пробирку к осадку добавить по 300 мкл раствора для отмывки № 2. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10-15 сек. Центрифугировать при 13000 об/мин в течение 2 мин на микроцентрифуге.

7.13. Не взбалтывая осадок, установить пробирки в магнитный штатив. Из каждой пробирки отобрать надосадочную жидкость пипеткой (или отсасывателем) с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.14. Высушить осадки в открытых пробирках в течение 2-3 мин при температуре от 18 до 25 °С.

7.15. В каждую пробирку к осадку добавить 200 мкл элюирующего раствора. Тщательно перемешать на вортексе, ресуспендируя магнитный осадок. Инкубировать в термошейкере в течение 5 мин при 65 °С с частотой вращения 1300 об/мин. Центрифугировать на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 1 мин. Пробы готовы к постановке ПЦР

Внимание! Выделенная ДНК хранится при температуре от 2 до 8 °С не более 24 ч.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Пробирки с подготовленными пробами установить в магнитный штатив.

8.2. Вскрыть упаковку с готовой реакционной смесью (ГРС) и отобрать необходимое количество (по числу подготовленных проб, включая контроли: 1 ОКО и 1 ПКО) пробирок с ГРС. Оставшиеся неиспользованными пробирки с ГРС упаковать в цефленовый пакет с осушителем, удалить из него лишний воздух и плотно закрыть зажим.

После первого вскрытия упаковки срок годности ГРС при температуре хранения от 2 до 8°С составляет 3 месяца.

8.3. Пробирки с ГРС пронумеровать и расположить в штативе.

Внимание! При использовании амплификатора «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q» надписи следует располагать на крышке пробирок. При использовании амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96», «ДТ-96» надписи следует располагать на боковой части пробирок.

8.4. В каждую пробирку пипеткой с отдельным наконечником с фильтром внести по 50 мкл соответствующего раствора выделенной ДНК (из пробирок, установленных в магнитный штатив). Не захватывать осадок! Плотно закрыть пробирки крышками.

8.5. Поместить пробирки в амплификатор.

8.6. Запрограммировать прибор для проведения амплификации специфического фрагмента ДНК и ВКО, а также детекции сигналов флуоресценции в соответствии с инструкцией к прибору.

8.6.1. Для приборов «iQ iCycler», «iQ5 iCycler» и «CFX96» (фирма Bio-Rad, США), ДТ-96 (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия):

8.6.1.1. Задать протокол проведения амплификации:

1 стадия: 50°C – 2 мин;

2 стадия: 95°C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°C – 10 сек, 60°C – 20 сек*).

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

8.6.1.2. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителя инфекции:

для регистрации результатов амплификации ДНК ВКО – канал детекции «FAM»;

для регистрации результатов амплификации ДНК микобактерий туберкулеза – канал детекции «ROX».

8.6.2. Для приборов «Rotor-Gene 3000», «Rotor-Gene 6000» (фирма Corbett Research, Австралия) и «Rotor-Gene Q» (фирма Qiagen, Германия):

8.6.2.1. Задать протокол проведения амплификации:

1 стадия: 50°C – 2 мин;

2 стадия: 95°C – 2 мин;

3 стадия: 50 циклов (94°C – 10 сек, 60°C – 40 сек*).

*Измерение флуоресценции проводить при 60°C.

8.6.2.2. Выбрать каналы детекции результатов амплификации ДНК ВКО и ДНК возбудителя инфекции:

для регистрации результатов амплификации ДНК ВКО – канал детекции «FAM»/«Green»;

для регистрации результатов амплификации ДНК микобактерий туберкулеза – канал детекции «ROX»/«Orange».

8.7. Запрограммировать положение пробирок с исследуемыми образцами, положительным и отрицательным контролями согласно инструкции к используемому прибору.

8.8. Запустить программу и провести ПЦР с флуоресцентной регистрацией результатов в режиме реального времени.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ результатов в случае использования планшетных амплификаторов «iQ5 iCycler», «CFX96» выполняется программой «РеалБест диагностика» (программа проводит все операции по анализу, отбраковке и вычислениям результатов).

При использовании других планшетных амплификаторов анализ результатов выполняется в автоматическом режиме в соответствии с настройками, указанными в инструкции по использованию прибора.

10. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. В отрицательном контрольном образце (ОКО) программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО в канале «FAM/Green» и определять C_t ВКО, при этом программа не должна регистрировать нарастание сигнала амплификации ДНК микобактерий туберкулеза в канале «ROX/Orange».

10.2. В положительном контрольном образце (ПКО) программа должна фиксировать:

- нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО в канале «FAM/Green» и определять значение порогового цикла C_t ВКО.
- нарастание сигнала амплификации ДНК микобактерий туберкулеза в канале «ROX/Orange» и определять значение порогового цикла C_t ПКО;

10.3. В каждом исследуемом образце программа должна фиксировать нарастание сигнала амплификации ДНК ВКО (канал «FAM/Green») и определять C_t ВКО.

10.4. Вычислить $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ как среднее значение C_t ВКО всех анализируемых образцов (включая ПКО и ОКО). Отбраковке подлежат значения C_t ВКО, отличающиеся более чем на 2 от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$. После отбраковки пересчитать $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ для оставшихся значений.

10.5. Результат анализа образца считается отрицательным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX/Orange» больше 40 или не определяется.

Если для такого образца значение C_t ВКО отличается от значения $(C_t \text{ ВКО})_{\text{ср}}$ более чем на 2, то результат исследования данного образца не подлежит анализу и учету как отрицательный. Необходимо провести повторный анализ данного образца, начиная с этапа выделения ДНК.

10.6. Результат анализа образца считается положительным, если для этого образца значение C_t в канале «ROX/Orange» меньше или равно 40.

10.7. Если для ОКО значение C_t в канале «ROX/Orange» меньше или равно 40, то это свидетельствует о наличии контаминации в системе. В этом случае положительные результаты, полученные в данной индивидуальной постановке ПЦР, считаются недостоверными. Требуется предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повто-

ритель анализ всех образцов данной постановки, для которых получен положительный результат. Образцы, анализ которых дал отрицательный результат, следует учитывать как отрицательные.

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

11.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток. Замораживание наборов не допускается.

11.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности. Замораживание наборов не допускается.

11.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

11.4. Запрещается использовать компоненты из наборов разных серий.

12. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора «РеалБест ДНК МВТС» требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630128, г. Новосибирск-128, а/я 102,

тел. (383) 332-92-49, 227-60-30; тел./факс (383), 332-94-47, 332-94-44.

E-mail: plkobtk@vector-best.ru

Начальник отделения
ЗАО «Вектор-Бест»

А.В. Трухина

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

В.К. Ткачев

«СОГЛАСОВАНО»
зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России



Подпись	
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись	
" "	20 ____ года

д.м.н., профессор В.В. Долгов
«15» ____ 20 ____ г.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью

сценарист **АИСТОВ**

И.И.И.

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест» М.Д. Хусаинов

